

# EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS

*EFFECT OF CHRONIC ETHANOL ADMINISTRATION ON LIPID PEROXIDATION IN RATS*

Alceu Afonso Jordão Jr.<sup>1</sup>; Mônica S.S.Meirelles<sup>2</sup>; Paula Garcia Chiarello<sup>1</sup> & Helio Vannucchi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutor em Ciências dos Alimentos e Nutrição. <sup>2</sup>Biomédica. <sup>3</sup>Docente Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

CORRESPONDÊNCIA: Dr. Alceu Afonso Jordão Jr. - Departamento de Clínica Médica - Divisão de Nutrologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Av. Bandeirantes 3900 - ep:14048-900 Ribeirão Preto-SP - email: aajordao@yahoo.com

JORDÃO JR AA; MEIRELLES MSS; CHIARELLO PG & VANNUCCHI H. Efeito da administração crônica de etanol sobre a peroxidação lipídica em ratos. **Medicina, Ribeirão Preto**, 35: 48-52, jan./mar.2002.

**RESUMO:** A geração de radicais livres é um passo importante na patogênese da injúria hepática, associada à ingestão de etanol. O etanol induz a aumento na peroxidação lipídica por dois mecanismos: maior produção de espécies reativas de oxigênio e/ou diminuição dos níveis dos antioxidantes endógenos. Este trabalho enfoca a geração de radicais livres em ratos, após a ingestão crônica de etanol na água (20%), pelo período de 4 semanas. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito do etanol sobre a peroxidação lipídica plasmática e hepática (medida por SRATB), vitamina E em plasma e fígado e glutatona hepática. Os animais receberam etanol por um período experimental de 4 semanas e foram sacrificados em 2 períodos distintos: 0 hora após o término das 4 semanas e 24 horas após o etanol ser retirado e substituído por água. Os animais que receberam etanol mostraram uma ingestão alimentar diminuída e alcançaram um peso menor, quando comparados aos ratos que receberam apenas água durante o experimento ( $p < 0,05$ ). O grupo sacrificado 24 horas após, demonstrou a concentração mais baixa de vitamina E hepática ( $5,96 \pm 3,30 \mu\text{g/g}$ ) em relação ao Grupo-Controle ( $35,78 \pm 9,23 \mu\text{g/g}$ ) e ao Grupo Etanol 0 horas ( $10,30 \pm 1,59 \mu\text{g/g}$ ). As concentrações hepáticas de SRATB foram encontradas em níveis aumentados nos animais que receberam etanol. Os valores de glutatona também foram afetados e se mostraram aumentados. Conclui-se que a administração crônica de etanol leva a uma alteração no sistema de defesa antioxidante, diminuindo os valores de vitamina E e aumentando os valores de GSH, provocando maior peroxidação lipídica.

**UNITERMOS:** Peroxidação de Lipídios. Radicais Livres. Etanol. Vitamina E. Glutaciona. Ratos.

## 1. INTRODUÇÃO

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio podem contribuir para uma variedade de doenças ou estar presentes em situações de toxicidade<sup>(1,2)</sup> como, por exemplo, diante de uma dose tóxica, aguda, de etanol. Por outro lado, os efeitos deletérios dos radicais livres podem ser inibidos pela presença de subs-

tâncias antioxidantes, como a vitamina E, que são capazes de inibir a ocorrência da peroxidação lipídica<sup>(3)</sup>.

Vitamina E é um termo que engloba um pequeno grupo de tocoferóis, sendo que o  $\alpha$ -tocoferol é o mais bioativo, também considerado o mais potente antioxidante de característica lipossolúvel, responsável pela proteção de ácidos graxos, poliinsaturados, de membranas contra a peroxidação lipídica<sup>(4)</sup>.

Outro antioxidante amplamente estudado é a glutatona (GSH). O decréscimo dos níveis de GSH pode refletir o aumento na produção de radicais livres num grau que excederia a capacidade de detoxificação do GSH<sup>(5)</sup>.

Já na década de 60, admitia-se a hipótese de que a ingestão de etanol poderia afetar a concentração de antioxidantes na célula hepática e que haveria um aumento na peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de ratos recebendo uma dose aguda de etanol<sup>(6)</sup>. Entretanto, outros autores não encontraram aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), índice indireto de peroxidação lipídica, quando os ratos foram tratados, tanto cronicamente como de forma aguda, com etanol<sup>(7)</sup>. Esses resultados discrepantes quanto à ocorrência de peroxidação lipídica, hepática, após a administração do etanol, são devidos às diferentes condições experimentais utilizadas. Acredita-se que a ingestão de etanol leva ao aumento da peroxidação lipídica por dois mecanismos que podem ocorrer de modo simultâneo: aumento das espécies reativas de oxigênio e decréscimo nos níveis dos antioxidantes<sup>(8)</sup>.

Acredita-se que a ingestão crônica de etanol pode levar à diminuição do  $\alpha$ -tocoferol hepático, não tendo a ingestão aguda os mesmos efeitos<sup>(9)</sup>. Os níveis de glutatona (GSH) hepática podem sofrer decréscimo, quando da administração de etanol. A formação de um aduto entre o acetaldeído resultante da oxidação do etanol e a glutatona pode representar um dos mecanismos da diminuição<sup>(10)</sup> ou, então, uma maior oxidação da glutatona, resultado direto do aumento na geração de radicais livre<sup>(11)</sup>.

Pode-se perceber que a administração do etanol é um fator de interferência no balanço oxidativo, atuando em favor da oxidação<sup>(12)</sup>, mas o período de recuperação dos animais após a ingestão crônica de etanol ainda é pouco estudado. Portanto, coloca-se o presente trabalho no sentido de averiguar os efeitos da administração crônica de etanol sobre a taxa de lipoperoxidação medida pelos SRATB, níveis plasmáticos e hepáticos de vitamina E e glutatona em dois momentos distintos, após 30 dias de consumo de etanol (30 dias-0 hora) e, na recuperação, após 24 horas sem álcool, depois dos 30 dias de consumo crônico (30 dias-24 horas).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, recém-desmamados, com peso médio de 60 gra-

mas e provenientes do Biotério Central da FMRP-USP. Os animais foram separados em três grupos:

Grupo Controle (n=10): ratos que receberam água *ad libitum* por um mês.

Grupo Etanol 0 hora (n=10): ratos que receberam etanol por um mês e foram sacrificados após esse período

Grupo Etanol 24 horas (n=10): ratos que receberam etanol por um mês e foram sacrificados após 24 horas, depois desse período,

O etanol foi administrado numa solução com 80% de água deionizada e 20% de etanol.

O preparo das dietas para os animais seguiu a recomendação da A.O.A.C de 1975<sup>(13)</sup>. Tanto as dietas como a água e a mistura etanol/água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram acomodados em gaiolas individuais com períodos de 12 horas de iluminação artificial, intercalados com período igual sem iluminação, em temperatura média de 22° C.

A ingestão foi controlada por meio de pesagem regular de comedouros, duas vezes por semana, e os animais pesados a cada 4 dias. Ao final dos 30 dias foram sacrificados os Grupos-Controle e Etanol 0 hora. Para o Grupo Etanol 24 horas foi suspensa a administração de etanol e os animais permaneceram recebendo água e alimentação normal durante as 24 horas, sendo sacrificados em seguida.

O sacrifício era realizado após anestesia com éter e a morte acontecia por exanguinação, após a retirada do sangue por punção cardíaca (ventrículo direito) para as determinações plasmáticas de vitamina E. Em seguida, o fígado era retirado, pesado e colocado imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) para dosagens posteriores de GSH, SRATB e  $\alpha$ -tocoferol.

## 3. MÉTODOS LABORATORIAIS

A dosagem de SRATB no fígado e plasma foi realizada de acordo com o método descrito por Buege & Aust<sup>(14)</sup>.

A análise da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) foi realizada em amostras de plasma e fígado por meio de HPLC (Shimadzu®), utilizando-se uma coluna do tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6x25 cm), pré-coluna 4 mm x 1 cm e fluxo de 2,0 mL/min, sendo a leitura feita em detector UV/Vis em 292 nm<sup>(15)</sup>. A forma reduzida da glutatona foi determinada pelo método descrito por Sedlack & Lindsay<sup>(16)</sup>. A determinação de proteína no fígado foi realizada pelo método de Lowry<sup>(17)</sup>.

As variáveis são apresentadas como média  $\pm$  desvio-padrão. As comparações entre os grupos fo-

ram feitas por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Quanto à evolução ponderal dos animais, a análise de variância entre as médias de pesos dos grupos experimentais, a cada semana, mostrou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos que receberam etanol, e o Grupo-Controle (Tabela I). A ingestão dietética também foi diferente, sendo que os ratos que recebiam etanol comiam menos em relação aos do Grupo-Controle. Por exemplo, na última semana do estudo, os animais-controle ingeriram uma média de  $19,81 \pm 6,14$  gramas de ração contra  $8,60 \pm 3,61$  gramas do Grupo Etanol 0 h e  $7,87 \pm 4,12$  gramas ingeridas pelos ratos do Grupo Etanol 24 horas.

Pela análise de variância, ficou demonstrado que os grupos que receberam etanol apresentaram valores mais elevados de SRATB no fígado, quando comparados com os do Grupo-Controle. Não existiu diferença significativa entre os grupos que receberam etanol, em relação aos valores das SRATB (Tabela II).

A Tabela II também mostra as concentrações hepáticas de GSH e as concentrações hepáticas e plasmáticas de vitamina E. A administração do etanol cronicamente levou ao aumento nos níveis do GSH hepático, quando comparados aos do Grupo-Controle; o va-

lor do GSH no Grupo Etanol 0 hora é praticamente 3 vezes maior que o controle ( $27,20 \pm 9,79$  e  $9,30 \pm 2,19$ , respectivamente).

Em relação à vitamina E, o maior valor foi encontrado no Grupo-Controle e o Grupo Etanol 0 hora mostrou valores maiores de vitamina E quando comparado com os do Grupo Etanol 24 horas, tanto na avaliação das concentrações hepáticas como nas plasmáticas.

#### 5. DISCUSSÃO

Os animais que receberam etanol ingeriram uma quantidade menor de ração e conseqüentemente, mostraram um peso menor, quando comparados aos do Grupo-Controle no final das 4 semanas experimentais. Os valores hepáticos das SRATB foram altamente influenciados pela ingestão crônica do etanol, combinada com a menor ingestão de vitamina E, sendo esse aumento significativo nos períodos de 0 e 24 horas após o período experimental, mostrando valores praticamente dobrados em relação aos do Grupo-Controle.

Os níveis hepáticos de glutathione reduzida (GSH) após o período de ingestão crônica de etanol foram alterados e os animais exibiram níveis de GSH aumentados em relação aos do Grupo-Controle. Um trabalho de revisão mostra que a relação entre a ingestão crônica de etanol e os níveis de glutathione não estão bem estabelecidos, existindo indicações que es-

**Tabela I: Evolução de peso, em gramas, nos diferentes grupos de ratos recebendo etanol**

	Controle	Etanol 0 hora	Etanol 24 horas
Peso inicial (g)	$49,27 \pm 6,72$ a	$52,38 \pm 5,89$ a	$53,14 \pm 5,77$ a
Peso final (g)	$256,16 \pm 17,01$ a	$148,33 \pm 11,84$ b	$140,51 \pm 10,05$ b

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença estatística para  $p < 0,05$ .

**Tabela II: Peroxidação lipídica e valores hepáticos e plasmáticos de vitamina E no fígado de ratos recebendo etanol**

	Controle	Etanol 0 hora	Etanol 24 horas
SRATB (nM/mg pt)	$0,05 \pm 0,01$ a	$0,09 \pm 0,01$ b	$0,10 \pm 0,01$ b
GSH (mM/g pt)	$9,30 \pm 2,19$ a	$27,20 \pm 9,79$ b	$25,07 \pm 3,22$ b
Plasma ( $\mu\text{mol/l}$ )	$18,99 \pm 4,35$ a	$8,15 \pm 3,49$ b	$2,41 \pm 0,85$ c
Fígado ( $\mu\text{g/g}$ )	$35,78 \pm 9,23$ a	$10,30 \pm 1,59$	$5,96 \pm 3,30$ c

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença estatística para  $p < 0,05$ .

ses níveis podem aumentar, decrescer ou mesmo permanecer inalterados frente à ingestão de etanol<sup>(18)</sup>. Postula-se que a deficiência da vitamina E pode ser compensada pelo aumento de GSH hepático<sup>(19)</sup>, o que foi observado neste experimento.

Em relação à vitamina E hepática e plasmática encontraram-se as maiores alterações frente à ingestão crônica de etanol em todos os três grupos estudados. Os grupos que receberam etanol mostraram uma queda drástica nos valores de vitamina E. O valor plasmático no tempo 24 horas representou apenas 12,69% em relação ao valor do Grupo-Controle, e, no fígado, o valor foi de apenas 16,65%. É interessante notar que, tanto em plasma quanto em fígado, houve uma redução significativa da vitamina E entre o período 0 hora e 24 horas. Provavelmente, a diminuição nos níveis de vitamina E mostram uma utilização da vitamina no processo de detoxificação e recuperação dos animais após o etanol. Sugere-se que estudos posteriores possam verificar, no prolongamento de experimento semelhante, se a vitamina E é reciclada e recuperada no período subsequente.

O aumento na produção dos SRATB é uma forte evidência de que a peroxidação lipídica é um dos mecanismos de dano tecidual, provocado pelo etanol. Por outro lado, o aumento nos níveis de glutatona pode representar uma resposta adaptativa à produção de radicais livres, no sentido de proteger os animais contra o dano hepático<sup>(20)</sup>.

Em relação à peroxidação lipídica dos animais, depois da ingestão crônica de etanol, demonstra-se que os níveis de peróxidos lipídicos hepáticos voltam ao normal depois de um período de 24 - 48 horas<sup>(21)</sup>.

Os resultados citados fortalecem a hipótese de que os efeitos hepatotóxicos do etanol são devidos ao aumento na produção dos intermediários das espécies reativas de oxigênio. A principal conclusão deste estudo é que a ingestão de etanol, combinada com a menor ingestão dietética diminui os níveis de vitamina E no fígado e plasma, mas aumenta a concentração de GSH hepático, sendo que os níveis da peroxidação lipídica permanecem aumentados e que ocorrem alterações bioquímicas importantes 24 horas após a suspensão da administração do etanol aos animais.

JORDÃO JR AA; MEIRELLES MSS; CHIARELLO PG & VANNUCCHI H. Effect of chronic ethanol administration on lipid peroxidation in rats. **Medicina, Ribeirão Preto**, 35, 48-52, jan./march 2002.

**ABSTRACT:** Free radical generation is an important step in pathogenesis of ethanol associated liver injury. Administration of ethanol induces an increase in lipid peroxidation both by enhancing the production of oxygen reactive species and decreasing levels of endogenous antioxidants. This work focuses the generation of free radical provoked by a chronic dose of ethanol. The objective of this investigation was to study the effect of 4 weeks chronic ethanol administration (20% in water) on liver lipid peroxidation, vitamin E in plasma and liver, and hepatic glutathione concentration. The animals were sacrificed in 0 and 24 hours after the ethanol administration. The control group received only distilled water during this period. Ethanol administration decreased the hepatic and plasmatic vitamin E in all groups, when compared to controls. The group sacrificed 24 hours after ethanol demonstrated the lowest concentration of vitamin E in liver ( $5,96 \pm 3,30 \mu\text{g/g}$ ) in relation to control group ( $35,78 \pm 9,23 \mu\text{g/g}$ ) and 0 hours group ( $10,30 \pm 1,59 \mu\text{g/g}$ ). Concentration of SRATB was higher in liver of rats that received ethanol. Glutathione were elevated by ethanol administration. In conclusion, chronic ethanol administration provokes an imbalance in antioxidant system, inducing liver lipid peroxidation in rats and decreased vitamin E levels.

**UNITERMS:** Lipid Peroxidation. Free Radicals. Ethanol. Vitamim E. Glutathione. Rats.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - HALLIWELL B. Antioxidants and human disease: A general introduction. **Nutr Rev** 55: S44-S52, 1997.
- 2 - FERREIRA AIA & MATSUBARALS Radicais livres: conceitos,

doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras** 43: 61-68, 1997.

- 3 - VANNUCCHI H; JORDÃO JUNIOR AA; IGLESIAS AC; MORANDI MV & CHIARELLO PG. Effect of different dietary levels of vitamin E on lipid peroxidation in rats. **Arch Latinoam Nutr** 47: 34-37, 1997.

- 4 - VANNUCCHI H; MOREIRA EAM; CUNHA DF; JUNQUEIRA-FRANCO MVM; BERNARDES MM & JORDÃO JR AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, **31**: 31-44, 1998.
- 5 - MEISTER A. Glutathione metabolism. **Methods Enzimol** **251**: 3-7, 1995.
- 6 - DI LUZIO NR & HARTMAN AD. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ethanol-induced fatty liver. **Fed Proc** **26**: 1436-1442, 1967.
- 7 - TORRIELLI MV; GABRIEL L & DIANZANI MU. Ethanol-induced hepatotoxicity: experimental observations on the role of lipid peroxidation. **J Pathol** **126**: 11-25, 1978.
- 8 - ISHII H; KUROSE I & KATO S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. **J Gastroenterol Hepatol** **12**: S272-S282, 1997.
- 9 - BJØRNEBOE GEA; BJØRNEBOE A & HAGEN BF. Reduced hepatic a-tocopherol content after long-term administration of ethanol to rats. **Biochim Biophys Acta** **918**: 236-241, 1987.
- 10 - VINA J; ESTRELA JM; GUERRI C & ROMERO FJ. Effect of ethanol on glutathione concentrations in isolated hepatocytes. **Biochem J** **188**: 549-552, 1980.
- 11 - VIDELA LA; FERNANDEZ V; DE MARINISA; FERNANDEZ N & VALENZUELA A. Liver lipoperoxidative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols pretreatment in rats. **Biochem Biophys Res Commun** **104**: 965-970, 1982.
- 12 - LIEBER CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. **Clin Chim Acta** **257**: 59-84, 1997.
- 13 - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 12th ed. Washington, p. 857, 1975.
- 14 - BUEGE JA & AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzimol** **52**: 302-310, 1978.
- 15 - ARNAUD J; FORTIS I; BLACHIER S; KIAD & FAVIERA. Simultaneous determination of retinol, a-tocopherol and b-carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. **J Chromatogr** **572**: 103-116, 1991.
- 16 - SEDLACK J & LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem** **25**: 192-205, 1968.
- 17 - LOWRY O H; ROSEBROUGH NJ & FARR AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** **193**: 265-275, 1951.
- 18 - JORDÃO JR AA; CHIARELLO PG; BERNARDES MM & VANNUCCHI H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, **31**: 434-449, 1998.
- 19 - TYÖPPÖNEN JT & LINDROS KO. Combined vitamin E deficiency and ethanol pretreatment: liver glutathione and enzyme changes. **Int J Nutr Res** **56**: 241-245, 1986.
- 20 - TEARE JP; GREENFIELD SM; WATSON D; PUNCHARD NA; MILLER N; RICE-EVANS CA & THOMPSON RP. Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol. **Gut** **35**: 1644-1647, 1994.
- 21 - ROUACH H; CLEMENT M; ORFANELLI MT; JANVIER B; NORDMANN J & NORDMANN R. Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. **Biochim Biophys Acta** **753**: 439-444, 1983.

Recebido para publicação em 01/10/2001

Aprovado para publicação em 25/02/2002